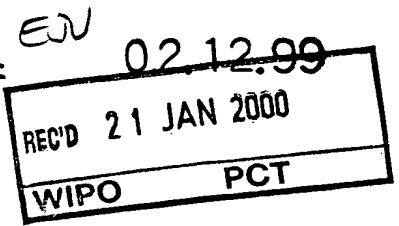


PCT/JP99/06294

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/6294



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年11月11日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第321143号

出願人

Applicant (s):

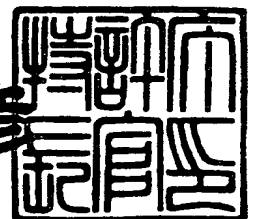
科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3092832

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP98176-YS

【提出日】 平成10年11月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/01

【発明の名称】 突然変異誘発方法

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 富山県射水郡小杉町太閤山 2 - 1 - 3 - 307

 【氏名】 田辺 清司

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区西葛西 6 - 6 - 8
 パークファミリア 605

 【氏名】 古澤 満

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

 【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009911

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

特平 1 0 - 3 2 1 1 4 3

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 突然変異誘発方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞または生物個体の二重鎖ゲノム DNA の一方の鎖に他方よりも多く点突然変異を導入することを特徴とする遺伝子への突然変異導入方法。

【請求項 2】 4 種の塩基に対しランダムに点突然変異を導入する請求項 1 の遺伝子突然変異導入方法。

【請求項 3】 細胞または生物個体が、突然変異修復機構遺伝子群にミューター遺伝子を有する変異細胞株または変異生物個体である請求項 1 または 2 の突然変異導入方法。

【請求項 4】 ミューター遺伝子が、dnaQ、dnaE、mutL、mutS、mutH、uvrD、dam からなる群より選択される 1 種または 2 種以上の変異遺伝子である請求項 3 の突然変異導入方法。

【請求項 5】 ミューター遺伝子が、所定の条件下で突然変異修復機構の欠損を生じさせる遺伝子である請求項 3 または 4 の突然変異導入方法。

【請求項 6】 突然変異修復機構の欠損条件が所定の温度である請求項 5 の突然変異導入方法。

【請求項 7】 所定の条件下でゲノム DNA へ突然変異を導入する工程と、突然変異を導入しない選択圧条件で変異体を選択する工程を繰り返すことを特徴とする請求項 5 または 6 の突然変異導入方法。

【請求項 8】 第 2 回目以降の突然変異導入工程を、直前の変異体選択工程と同一の選択圧下で行う請求項 7 の突然変異導入方法。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 8 のいずれかの方法によってゲノム DNA に突然変異が導入された細胞または生物個体の突然変異体。

【請求項 10】 請求項 9 の突然変異体より単離された変異遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願は、細胞または生物個体に効率良く突然変異を導入でき、かつ、処理

細胞や処理個体群の絶滅の危険性を低減できる、有効かつ効果の高いランダム突然変異導入方法と、この方法によって得られる変異体および変異表現型遺伝子に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】

細胞や生物個体を遺伝的に改変する技術には、細胞や生物個体に紫外線、放射線、変異原物質等の変異原を作用させて遺伝子にランダム突然変異を誘発させる方法、細胞や生物個体に外来の遺伝子を導入して遺伝子工学的に改変する方法等がある。また、特定の遺伝子に突然変異を誘発させる場合にはPCR増幅技術を利用してDNAに複製ミスを蓄積させるインビトロ突然変異誘発や部位特異的突然変異誘発などの遺伝子工学的手法を利用する方法も知られている。

【0003】

一般に、改変したい遺伝子や変異を導入する部位などが明らかとなっている場合は遺伝子工学的手法が有効な場合があるが、改変したい表現型やその遺伝子についての知識が不十分な場合においては、遺伝子にランダムに突然変異を導入し、得られる変異体から目的とする変異表現型を有する細胞や生物個体を選択するランダム突然変異誘発を利用する方法が有効である。このランダム突然変異誘発には細胞や生物個体に紫外線やX線、あるいは、放射線を照射して突然変異を誘発させる方法、ナイトロジェン・マスタードやニトロソグアニジンなどの変異原物質を作用させて突然変異を誘発させる方法がある。

【0004】

従来のランダム突然変異の導入技術においては、紫外線や変異原などにより誘発される突然変異率が処理の効率や効果に重要な影響を及ぼしている。すなわち、誘発される突然変異率が至適な範囲内においてはDNAに有効な量の突然変異が蓄積されるが、至適量より少なければ導入された突然変異がDNAの修復機構等により修復されることがあり、効率よく突然変異を導入できない。また、至適量を超えた場合は、導入される突然変異による生物体への致死効果が強くなり、目的の変異体を得る前に突然変異導入処理群が絶滅し、目的とする変異体を得られない結果となる。

【0005】

また、至適量は一回の処理あたりの量のみならず、より有用性の高い変異体を得るために変異導入処理と変異体の選択を複数回交互に継続して行う場合も同様で、注意深く至適量を決定しなければ効率が悪いが、または変異導入処理群の絶滅によって、結果的に有用性の高い変異体を得ることができない。さらに、ランダム突然変異導入によって改変したい細胞や生物個体の表現型が単一の遺伝子に複数の突然変異を導入する必要がある場合や、複数の遺伝子に突然変異を導入する必要がある場合などは、これらの遺伝子に好ましい変異が蓄積されるまでランダム突然変異を挿入する必要があるが、多数の突然変異の蓄積は生存に必要な遺伝子にも致死的な変異が導入される危険が高くなり、突然変異率を高くすればするほど処理した細胞や生物個体の絶滅の危険性が高まり、効率的に有用な突然変異体を得ることが期待できなくなる。

【0006】

また、最近、細胞や生物個体を遺伝的に改変する目的ではないが、それぞれ、DNA塩基対のミスペアの校正機能、A/T-G/Cトランスバージョン、DNAのミスマッチ修復等に係わるミューテーター遺伝子であるmutD、mutS、mutTを同時に持つ大腸菌変異株の突然変異率が野生株の5千倍であることを利用し、この菌株内でプラスミドに挿入した遺伝子に効率よくランダム突然変異を導入する方法も開発されている(Molecular Biotechnology 7:189-195, 1997)。この方法によると24世代、約1日の培養でプラスミド上の遺伝子に1,000塩基対当たり1個の突然変異を導入できる。しかしながら、このような高い突然変異率は変異を導入したい遺伝子の変異誘発の確率を増加させるが、同時に生存に必要な遺伝子など他の遺伝子にも変異を導入する危険性を高める。このため、突然変異を導入したいDNA領域の長さが100塩基対以下である場合や何カ所にも突然変異を入りたい場合は、増殖世代数が増大し実際的でないという理由でPCR法が推奨されている。また、突然変異率が高いために本菌株の長期的な培養は菌自体やその遺伝子型が影響を受けるので注意が必要であることも指摘されている。従って、この方法は宿主に導入したプラスミド上の遺伝子に突然変異を導入するには適していても、宿主自体を遺伝的に改変することには適していない

【0007】

以上のとおり、従来の細胞や生物個体へのランダム突然変異導入方法においては、多くの突然変異導入と変異導入処理群の絶滅回避とは二律背反の要件であって、多様かつ有用な変異体を高率よく得ることは困難であった。

この出願の発明は、以上の事情に鑑みてなされたものであって、細胞や生物個体に高い突然変異率でランダム突然変異を導入しつつ、同時に処理群の絶滅の危険性を低減し、効率よく有用かつ多様な突然変異体を得る方法を提供することを課題としている。

【0008】

【問題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決する発明として、細胞または生物個体の二重鎖ゲノムDNAの一方の鎖に他方よりも多く点突然変異を導入することを特徴とする遺伝子への突然変異導入方法を提供する。

この発明の突然変異導入方法における第1の好ましい態様は、二重鎖ゲノムDNAを構成する4種の塩基に対してランダムに点突然変異を導入する突然変異導入方法である。

【0009】

第2の好ましい態様は、細胞または生物個体が、突然変異修復機構遺伝子群にミューテーター遺伝子を有する変異細胞株または変異生物個体である突然変異導入方法である。なお、この変異細胞株または変異生物個体は、ミューテーター遺伝子を本来的に有するものでもよく、あるいは外来性のミューテーター遺伝子を導入されたものでもよい。

【0010】

第3の好ましい態様は、上記方法において、ミューテーター遺伝子が、dnaQ、dnaE、mutL、mutS、mutH、uvrD、damからなる群より選択される1種または2種以上のミューテーター遺伝子である突然変異導入方法である。

第4の好ましい態様は、上記方法において、ミューテーター遺伝子が、所定の

条件下で突然変異修復機構の欠損を生じさせる遺伝子である突然変異導入方法である。

【0011】

第5の好ましい態様は、上記方法において、突然変異修復機構の欠損条件が所定の温度である突然変異導入方法である。

第6の好ましい態様は、上記方法において、所定の条件下でゲノムDNAへ突然変異を導入する工程と、突然変異を導入しない選択圧条件で変異体を選択する工程を繰り返すことを特徴とする突然変異導入方法である。

【0012】

第7の好ましい態様は、前記態様において、第2回目以降の突然変異導入工程を、直前の変異体選択工程と同一の選択圧下で行う突然変異導入方法である。

この出願はまた、別の発明として、上記の突然変異導入方法のいずれかによってゲノムDNAに突然変異が導入された細胞または生物個体の突然変異体、およびこの突然変異体より単離された変異遺伝子を提供する。

【0013】

【発明の実施の形態】

自然突然変異は次の様な経緯で固定される。まず、染色体DNAに物理的、化学的に影響を与える生体内代謝産物や酸素ラジカルなどにより損傷が発生したり、DNA複製のエラーなどにより誤った塩基対が生じる。このような染色体DNAに生じる損傷や複製エラーは前変異損傷と呼ばれ、この前変異損傷が次のDNA複製の際に修復されないと染色体DNAに突然変異として固定される。自然突然変異における前変異損傷発生の原因の殆どは複製エラーであり、物理的、化学的な影響による染色体DNAの損傷の割合は少ない(CRC, 1(3):140-148, 1992)。複製エラーはDNA合成の際に4種の塩基の互変異性に基づく誤った塩基対の形成によって起こり、その頻度は 10^{-4} から 10^{-5} である(Molecular Biology of the Cell, Garland Publish Inc. New York & London 224-225, 1983)。一方、細胞には種々の突然変異修復機能があり、DNA合成酵素の持つ校正機能やミスマッチ修復系などによってそれぞれ 10^{-3} 程度ずつ前変異損傷は修復され、最終的に塩基置換による点突然変異が固定される頻度は1塩基あたり 10^{-1}

10^0 から 10^{-11} まで低下する (CRC, 1(3):140-148, 1992)。この他にも、塩基の挿入、欠失によるフレームシフト突然変異があるが、その頻度は非常に小さい。

【0 0 1 4】

従来のランダム突然変異誘発処理は、放射線、紫外線などのエネルギー線照射や変異原物質処理による物理的、化学的な影響を強めて染色体DNAに前変異損傷を増加させ、その変異が固定化される確率を高めるものである。変異原の種類と誘発される前変異損傷にはそれぞれ特徴があり、例えば、紫外線では点突然変異と欠失突然変異が同程度誘発されるが点突然変異ではG/C→A/T方向のトランジション変異がよく起こるとされている。また、X線ではDNA鎖の二本鎖の一方のみが切断される1本鎖切断と両方が切断される2本鎖切断があり、その結果、点突然変異や欠失突然変異が引き起こされるが欠失突然変異が点突然変異よりも10倍起こりやすい(分子放射線生物学、近藤宗平著、東京大学出版会、138-139、1972年)。

【0 0 1 5】

一方、複製エラーや突然変異の修復に関係し、突然変異を増加させるミューター遺伝子には様々なものが知られており、その機能別に5つに分類することができる(CRC, 1(3):140-148, 1992)。第1は、DNA複製エラーの制御系に係わるDNA合成酵素の α サブユニットの変異である。現在までに知られているのはdnaE遺伝子であり、このミューター遺伝子は突然変異を千倍から10万倍増加させる。第2は、ミスペアを即座に取り除く校正機能に関与するDNA合成酵素の ϵ サブユニットの変異である。このミューター遺伝子としてはdnaQ (mutD) が知られており、これも千倍から10万倍突然変異を増加させる。第3は、校正機能が修正し損なったミスペアを除去修復する mismatches 修復に係わるもので、mutL、mutS、mutH、uvrD、dam、mutY、mutM、ung が知られており、それぞれ10倍から千倍突然変異を増加させる。第4は、DNA原料となるヌクレオチドプールの浄化機能に関するもので、A/T→G/Cトランスバージョンのみを増加させるmutTが知られている。このミューター遺伝子を持つ細胞は増殖に伴ってDNA中のGC含量

を増加させていき、千倍から一万倍の変異を誘発する。最後のグループにはmut A、mut Cが属し、これらは全てのタイプのトランスバージョンを10倍程度増加させるが、その機能については良く知られていない。

【0016】

このように突然変異の原因となる前変異損傷の成因と誘発される突然変異は変異原によって異なっており、このことはランダム突然変異誘発にどのような変異原を用いるかによって、その効果が異なる可能性があることを示唆している。また、ランダム突然変異の効果を高めるためには、塩基の挿入や欠失によるフレームシフト突然変異や特定の塩基対のトランスバージョンの頻度を増加させるより、全ての塩基に対してランダムに点突然変異を導入することが有効である。

【0017】

この出願の発明者らは、二重鎖DNAの両方のDNA鎖に均等に突然変異が入った場合（パリティ）と一方のDNA鎖に突然変異が不均衡に蓄積された場合（ディスパリティ）の突然変異数とその分布に関するシュミレーションを行っている。その結果、ゲノムあたり一回の分裂で一カ所の突然変異が入る条件（パリティ）では、10世代後の突然変異の分布は12回のシュミレーションの全てで突然変異数のモードが10個付近にあり、その分布は2個から20個となること、また、世代を重ねると概ね世代数が突然変異数のモードとなり、同様の分布がシフトする傾向があることを示している。一方、全体の突然変異率は同じでも二重鎖DNAの片方の鎖にもう片方の100倍以上の確率で突然変異が入る条件（ディスパリティ）では、10世代後の突然変異数のモードは10個であるがその分布は0個から24個となることを見出している。このことは、総突然変異数が同じでも、DNA鎖の一方に多く突然変異が蓄積される場合は世代経過後の突然変異数の分布が異なることを示している（J. Theoretical Biology 157, 127-133, 1992）。

【0018】

発明者らによるこれらの知見はランダム突然変異を導入する際に重要である。前変異損傷を起こさせる原因として放射線、紫外線などのエネルギー線や変異原物質を用いた場合には、二重鎖DNAの両方の鎖にランダムに前変異損傷が誘起

されると考えられる。この場合の突然変異数の分布は上述のパリティの場合と同様である。一方、ミューテーター遺伝子の多くは前変異損傷を修復する機能に関係しているので、結果として固定される突然変異数の分布は次の様に理解される。mut TはA/T-G/Cの塩基特異的な修復機能に関係するので、突然変異はGC塩基対増加的である。これに対し、mut Y、mut M、ungはmut Tとは逆の塩基依存性であり、同様にAT塩基対増加的である。dna E、dna Qは二重鎖DNAのラギング鎖での複製エラーの制御、校正機能に関与しているためにDNA鎖依存性である。mut L、mut S、mut Hやuvr D、damはミスマッチ修復に関与しているが、塩基やDNA鎖に対して特異性はないので、前変異損傷の状態を反映すると考えられる。同様にmut Aおよびmut Cも塩基やDNA鎖に対する特異性はなく、全てのタイプのトランスポージョン修復に関与する。

【0019】

ところで、実際の突然変異の効果は、致死的效果を持つもの、遺伝子機能に影響を与えないか殆ど与えない中立的なもの、機能に何らかの変更が加わるものに分けられる。一般に致死的效果を示さない突然変異が保存される可能性がある。また、突然変異のランダム性についてはミューテーター遺伝子の機能を考えると、mut T、mut Y、mut M、ungは特定の塩基対を増加させる傾向がある。また、変異原の中にもチミジンダイマーを形成させるなど特定の前変異損傷を増加させるものがある。このようなタイプの突然変異誘発はランダム性に関して充分でないことが予想され、これらを突然変異誘発に用いると特定の変異が蓄積されることとなり、生物体の遺伝的改良効果に制限が生じる可能性がある。

【0020】

一方、DNA合成の際には4種の塩基の互変異性に基づく誤った塩基対の形成は4種の塩基に対してランダムに起こり、これに基づく前変異損傷が修復されなければ染色体DNAにランダムな突然変異を導入することができると考えられる。これらを可能にするのはdna Eやdna QなどDNA校正機能に係るミューテーター遺伝子である。

【0021】

さらに、この出願の発明者らは、温度感受性変異性のミューテーター遺伝子である dnaQ 49 を持つ大腸菌に挿入したプラスミドにおいて、数回の複製後、ラギング鎖のほうがリーディング鎖よりも数倍から百倍、突然変異率が高いことを見いだしている (Mol. Gen. Genet., 251:657-664, 1996)。二重鎖 DNA に不均衡に突然変異が蓄積されることは均衡に蓄積される場合と異なり、突然変異の多様性が高まると推察される。

【0022】

細胞または生物個体に絶滅の危険性を低下させつつ効率的、効果的に突然変異を導入するためには、処理群に存在する細胞や生物個体の遺伝的多様性を大きくすることが必要であり、そのためには4種の塩基にランダムに点突然変異を導入しつつ、二重鎖 DNA に不均衡に点突然変異を分布させることが重要である。

この出願の発明者らは、これらの知見に基づき、DNA鎖の一方に他方より多くのランダムな点突然変異を多く蓄積させることにより、突然変異率を上げつつ変異処理細胞や生物個体の絶滅の危険性を低下させて効率的、効果的に突然変異体を得る方法を開発した。具体的には、例えば、遺伝的に改変または改良を行いたい細胞や生物個体に校正機能に係るミューテーター遺伝子を導入し、DNA鎖の一方に他方より多くランダムな点突然変異を蓄積させる条件で突然変異誘発処理を行う。また、ミューテーター遺伝子に温度感受性などの条件発現的ミューテーター遺伝子を利用することも好ましい。このようなミューテーター遺伝子を用いた場合には、温度条件等の操作によって、突然変異の導入と変異体の固定を任意に設定することが可能となる。誘発させる突然変異率は好ましくは自然突然変異の100倍から10万倍の範囲で、一方のDNA鎖が他方に対して数倍から100倍以上の突然変異を蓄積する条件が適当である。

【0023】

なお、ミューテーター遺伝子を持つ細胞や生物個体は公知の方法 (Journal of Bacteriology, 153, 1361-1367, 1983) によって得ることができる。また、遺伝子工学的にミューテーター遺伝子を導入することも可能である。

さらに、突然変異を導入する工程と変異体を選択する工程を別個に行い、突然変異を誘発する工程では選択圧をかけない条件で行い、処理個体群を一定の数ま

で増殖させた後、変異体を固定、選択する工程を行い、2回目以降、同様の操作を繰り返すことにより効率的、効果的に目的とする突然変異体を得ることができる。

【0024】

以下、実施例を示し、この出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0025】

【実施例1】

温度感受性のミューテーター遺伝子 (dna Q) を持つ KH1366 (dna Q49) 株および KH1370 (dna Q+) 株 (奈良先端科学技術大学院大学の真木寿治教授より入手) を培養し、各々のアンピシリン耐性の程度を測定した。

【0026】

なお、dna Q49 株は、DNAポリメラーゼIII の ϵ サブユニットが変異しており、DNAポリメラーゼIII のプルーフリーディング機能に欠陥がある。このためDNA複製エラーを校正できず、全ての塩基置換による変異が発生する。この変異は温度感受性であるために培養温度が24℃から37℃にシフトすることにより、突然変異率が 10^{-9} から 10^{-4} に増加する。一方、dna Q+ 株は dna Q49 株の復帰突然変異によりDNAポリメラーゼIII の ϵ サブユニットが正常になった株である。この dna Q+ 株は dna Q49 株の野生型として用いた (以下、dna Q+ 株を野生型と記載することがある)。

【0027】

まず、突然変異を誘発していない dna Q49 株および野生型を種々の濃度のアンピシリンを含む寒天培地に播種し、24℃で2日間培養してコロニーを形成させ、dna Q49 株および野生株のアンピシリン濃度-生存曲線を作成した。Ampicillin Sodium Salt (SIGMA, A-9518) は精製水に溶解して原液とし、培養液に望む希釈濃度になるよう加えた。また、濃度-生存曲線の作成には培養液の 550 nm に於ける吸光度測定により行った。

【0028】

結果は図1に示したとおりであり、dna Q49株のほうが生型よりもわずかにアンピシリン耐性が強いことが確認された。

次いで、dna Q49株および生型を、各々、5mlのL-broth培地に2,000個/mlの密度で播種し、変異導入温度である37℃で24時間培養した。なお、生型には、公知の変異原物質である1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG; Aldrich 12, 994-1) を0~60 µg/ml培地の濃度で培地に加えた。

【0029】

24時間培養後に増殖してきた菌を回収し、様々なアンピシリン濃度の培地で24℃で48時間培養し、各大腸菌の生残率をコロニー形成法により決定した。

図2は、37℃で24時間変異させたdna Q49株、生型およびMNNG生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生残曲線である。dna Q49株のアンピシリン耐性最大濃度は30 µg/mlであり、生型およびMNNG生型(3~6 µg/ml)に比べ有意に高いことが確認された。なお、60 µg/ml濃度のMNNG存在下で培養した生型は全く増殖しなかったことから、高濃度のMNNGは生存に必要な遺伝子にも変異を生じさせ、その結果として絶滅したものであると考えられる。

【0030】

次いで、上記24℃の培養において生育した最大濃度のアンピシリン含有培地のコロニーを用い、第2回目の突然変異導入を行った。すなわち、dna Q49株は30 µg/mlのアンピシリン含有培地で、MNNG10 µg/ml処理群はアンピシリン6 µg/ml含有培地で、その他のMNNG処理群は3 µg/mlアンピシリン含有培地でそれぞれ24℃で培養し、増殖した菌を洗浄後、2000個/mlの密度に調整し、37℃で24時間培養した。次いで、菌を洗浄した後、種々のアンピシリン濃度の培地に播種し、24℃で2-3日間培養し、コロニーを形成させ、各大腸菌の生残率を測定した。なお、MNNG処理群は実施例2と同様の濃度のMNNGを処理した。

【0031】

図3は、2回目の変異導入を行ったdna Q49株、生型および各MNNG

処理群のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生存曲線である。dna Q49株のアンピシリン耐性最大濃度は $300\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、野生型およびMNNG野生型($6\sim 30\mu\text{g}/\text{ml}$)に比べ有意に高いことが確認された。なお、図3に結果を示していないMNNG処理群は絶滅したことを示している。

【0032】

以下、同様の操作を繰り返し、5回目まで変異導入を行った。24℃での増殖におけるアンピシリン濃度(前のコロニー形成時におけるアンピシリン耐性最大濃度)および24℃でのコロニー形成日数は表1に示したとおりである。また、図4～6はそれぞれ第3～5回目の変異導入後のアンピシリン濃度-生存曲線である。

【0033】

これらの結果から明らかなように、5回目までの変異誘発処理によって、約6,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン存在下でも増殖するdna Q49株が得られた。また、同様の変異導入操作を別のdna Q49株で実施したところ、5回の変異誘発処理によって約10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までのアンピシリン耐性菌株が得られた(図7)。なお、このような操作の過程で絶滅したdna Q49株は無かった。この菌体内にはプラスミドは存在せず、この耐性能がゲノム遺伝子の変異によるものであることが示された。

【0034】

【表1】

菌株 (MNNG 濃度)	1回目		2回目		3回目		4回目		5回目	
	amp 濃度	培養 日数	amp 濃度	培養 日数	amp 濃度	培養 日数	amp 濃度	培養 日数	amp 濃度	培養 日数
d n a Q 4 9	30	8	300	6	1000	5	3000	16	6000	
野生型 (0)	3	8	10	6	10	5	10	16	60	
野生型 (1)	3	8	10	6	10	5	10	16	60	
野生型 (3)	3	8	30	6	100	5	300	16	絶滅	
野生型 (6)	3	8	6	6	10	5	10	16	30	
野生型 (10)	6	8	絶滅							
野生型 (30)	3	8	絶滅							
野生型 (60)	絶滅									

【0035】

また、このアンピシリン耐性 d n a Q 4 9 株に対する種々の抗生物質の最小増殖阻止濃度 (MIC) を調べたところ、アンピシリンと同様の β -ラクタム系抗生物質であるセフトキシムに対しても強い耐性を示したが、アンピシリンとは作用機序の異なる抗生物質に対しては耐性能を獲得していなかった (表2)。なお、これまで報告されているアンピシリン耐性大腸菌の耐性濃度は $1, 500 \mu\text{g/ml}$ であるが、この耐性能はプラスミドによるものである。また、アンピシ

リンを加えずに 37℃ で変異誘発を行った場合には、10 回の操作でもアンピシリン耐性菌を得ることは出来なかった。

【0036】

これらの結果、変異原を用いたコントロールおよびこれまで報告されている耐性菌に比べ、高濃度のアンピシリンに耐性を示す耐性菌を短期間に獲得することができた。一方、MNNG 処理群では、高濃度処理では菌の絶滅が起こり、低濃度処理では 300 μ g/ml の耐性菌しか得られなかった。

【0037】

【表 2】

	dnaQ	Wild-type	スーパーアンブ耐性 dnaQ
Ampicillin	2	1	2048
Cefotaxime	0.0313	0.0156	64
Chloramphenicol	1	0.5	0.5
Tetracyclin	0.25	0.25	0.25
Rifampicin	8	4	2
Streptomycin	1	1	0.5
Nalidixic acid	1	2	0.5
Ofloxacin	0.0156	0.0625	0.0156
	スーパーストレ耐性 dnaQ		
Streptomycin		2048	
	スーパーナリ耐性 dnaQ		
Nalidixic acid		2048	
	スーパーオフロ耐性 dnaQ		
Ofloxacin		1024	

【0038】

実施例 2

実施例 1 と同様にして dnaQ 49 株に変異を導入し、オフロキサシン、ナリジキ酸、ストレプトマイシンの各々に対する薬剤耐性菌を作製した。その結果、表 3～5 に示したとおり、500 μ g/ml までのオフロキサシン耐性菌、7,

000 μ g/ml のナリジキ酸に対する耐性菌、26, 000 μ g/ml のストレプトマイシンに対する耐性菌を得た。

【0039】

【表3】

変異誘発処理	オフロキサシン濃度 (μ g/ml)	培養日数
1回目	0.001	11
2回目	0.01	6
3回目	0.1	9
4回目	1	4
5回目	10	3
6回目	30	3
7回目	50	3
8回目	60	3
9回目	70	3
10回目	80	3
11回目	90	3
12回目	100	7
13回目	120	3
14回目	132	3
15回目	144	3
16回目	150	7
17回目	156	3
18回目	168	2
19回目	180	2
20回目	210	2
21回目	240	2
22回目	270	2
23回目	300	2
24回目	320	6
25回目	330	4
26回目	340	4
27回目	350	3
28回目	360	4
29回目	370	3
30回目	380	4
31回目	400	2
32回目	425	3
33回目	450	3
34回目	475	3
35回目	500	3

*1: 変異誘発前の培養は、オフロキサシン濃度 0.01μ g/ml、
24℃、48時間とした。

*2: 変異誘発条件では、37℃で培養した。

*3: dnaQ+株（野生型）は 0.1μ g/ml のオフロキサシン
存在下では増殖しなかった。

【0040】

【表4】

変異誘発処理	ナリジキ酸濃度 (μ g/ml)	培養日数
1 回目	1	1
2 回目	10	1
3 回目	100	28
4 回目	200	2
5 回目	400	3
6 回目	600	2
7 回目	1000	2
8 回目	1100	1
9 回目	1200	1
10 回目	1300	1
11 回目	1400	1
12 回目	1600	1
13 回目	1800	2
14 回目	2000	1
15 回目	2500	1
16 回目	3000	1
17 回目	4000	1
18 回目	5000	9
19 回目	6000	5
20 回目	6200	11
21 回目	6400	7
22 回目	6600	5
23 回目	6800	5
24 回目	7000	

*1: 変異誘発前の培養は、ナリジキ酸濃度 1μ g/ml、
24℃、48時間とした。

*2: 変異誘発条件では、37℃で培養した。

*3: dnaQ+株(野生型)は 10μ g/ml のナリジキ酸
存在下では増殖しなかった。

【0041】

【表 5】

変異誘発処理	ストレプトマイシン濃度 (μ g/ml)	培養日数
1 回目	1	3
2 回目	10	1
3 回目	100	28
4 回目	1000	2
5 回目	3000	2
6 回目	4000	2
7 回目	6000	2
8 回目	8000	2
9 回目	9000	3
10 回目	10000	4
11 回目	12000	4
12 回目	14000	8
13 回目	16000	5
14 回目	17000	11
15 回目	18000	3
16 回目	19000	6
17 回目	20000	5
18 回目	21000	5
19 回目	22000	6
20 回目	23000	4
21 回目	24000	8
22 回目	25000	10
23 回目	26000	

*1: 変異誘発前の培養は、ストレプトマイシン濃度 1μ g/ml、
24℃、48時間とした。

*2: 変異誘発条件では、37℃で培養した。

*3: dnaQ+株（野生型）は 10μ g/ml のストレプトマイシン
存在下では増殖しなかった。

【0042】

また、オフロキサシン耐性菌において、菌の耐性獲得に関連する酵素の変異を解析したところ、耐性度の低い菌（ $1 \sim 30 \mu$ g/ml）ではジャイレースAの83位のセリンがロイシンに変異していた。また、耐性度 100μ g/ml の菌はジャイレースAの83位のセリンがロイシンに変異しているのに加え、耐性増加に必要な他の酵素であるトポイソメラーゼIVの80位のセリンがアルギニンに変異していた（表6）。この結果から、この発明の方法によって、複数の遺伝

子に効率よく変異導入が可能であることが示された。また、導入された変異は臨床的に観察された耐性菌の変異と同じものであり、耐性能が上昇するにつれて固定される変異が増加する耐性獲得のメカニズムも同じものであった (J. Infect C hemother 3:128-138, 1997)。

【0043】

以上の結果は、この発明の方法が、種々の生物機能の発現に関連する複数の遺伝子を一度に改変することが可能であること、そして、そのような遺伝子の多様な改変により、薬剤耐性菌など新たな変異体の出現予測やそのメカニズムの解明などに利用できることを示している。

【0044】

【表6】

菌の耐性度 (OFLX)	GyrA	ParC
0.1 μ g/ml	no	no
1.0 μ g/ml	83-Ser \rightarrow Leu	no
3.0 μ g/ml	83-Ser \rightarrow Leu	no
30.0 μ g/ml	83-Ser \rightarrow Leu	no
100.0 μ g/ml	83-Ser \rightarrow Leu	83-Ser \rightarrow Arg

【0045】

実施例3

実施例1と同様にして dna Q 49 株に変異を導入し、アルカリ耐性菌を作製した。その結果、表7に示したとおり、12回の突然変異誘発により pH 9.8 までの耐性菌を得た。

【0046】

【表 7】

変異誘発処理	pH	培養日数
1 回目	9.5	2
2 回目	9.4	2
3 回目	9.4	3
4 回目	9.4	2
5 回目	9.5	3
6 回目	9.5	2
7 回目	9.5	2
8 回目	9.7	39
9 回目	9.7	2
10 回目	9.7	3
11 回目	9.7	16
12 回目	9.8	

*1：変異誘発前の培養は、pH9.5、24℃、48時間とした。

*2：変異誘発条件では、37℃で培養した。

*3：dnaQ+株（野生型）はpH9.5では増殖しなかった。

【0047】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、微生物や細胞、または生物個体の多様かつ有用な変異体を効率的、効果的に作製することができる。また、遺伝子の変異の状況を解析することにより、薬剤耐性のメカニズムの解明、新規な耐性菌の発生予測やその対応薬剤の開発への利用やガン遺伝子の変異と転移や悪性度の増加のメカニズムの解析とその治療法の開発等が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

変異導入前の dnaQ49 株および野生株のアンピシリン濃度－生存曲線である。

【図 2】

第 1 回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生存曲線である。

【図 3】

第 2 回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアン

ピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生存曲線である。

【図4】

第3回目の変異導入後の dna Q49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生存曲線である。

【図5】

第4回目の変異導入後の dna Q49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生存曲線である。

【図6】

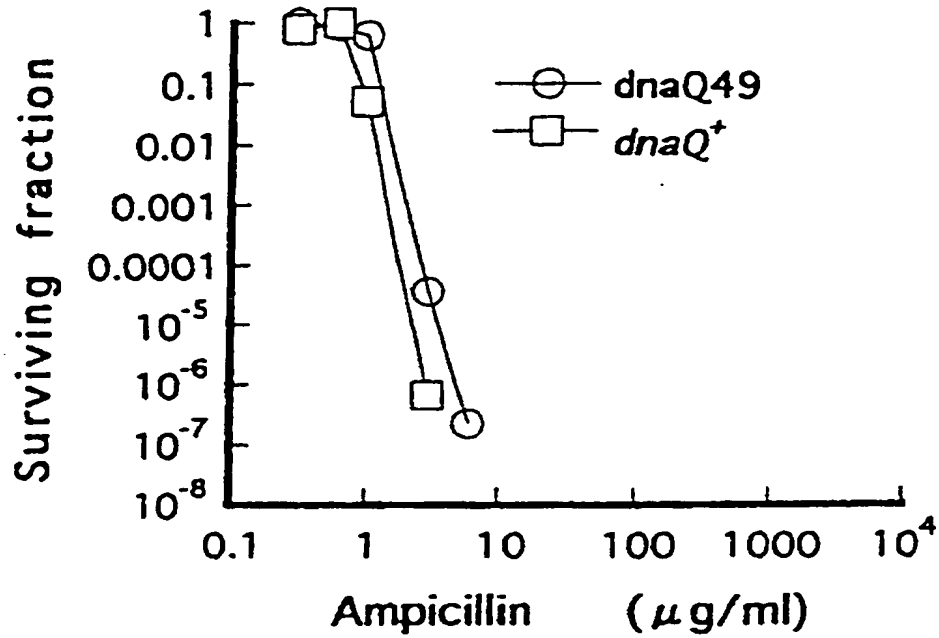
第5回目の変異導入後の dna Q49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生存曲線である。

【図7】

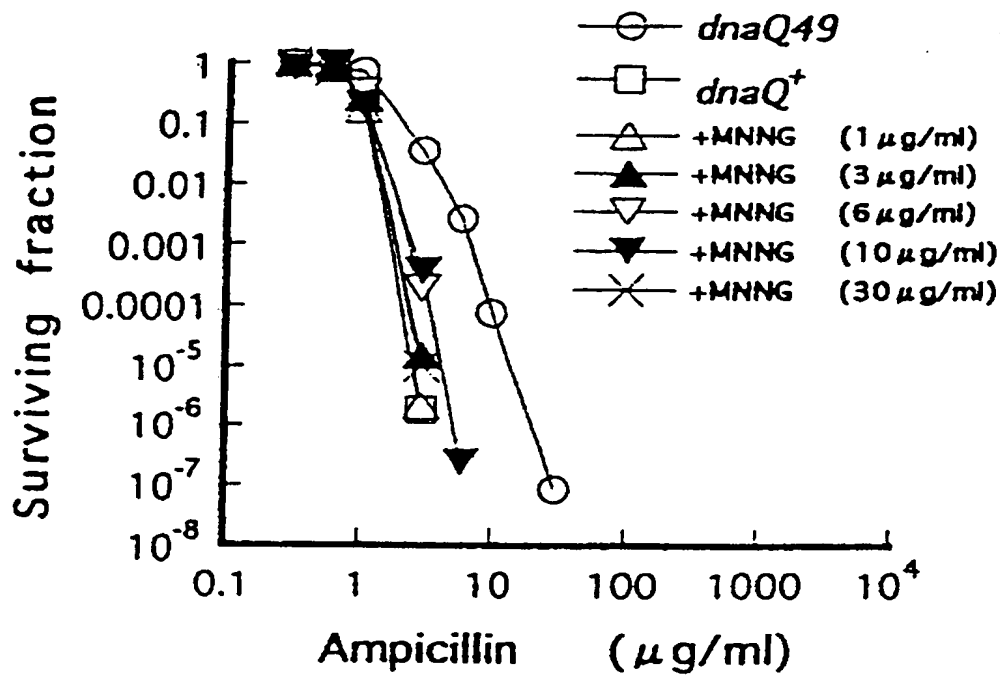
別の dna Q49 株における第5回目の変異導入後のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度-生存曲線である。

【書類名】 図面

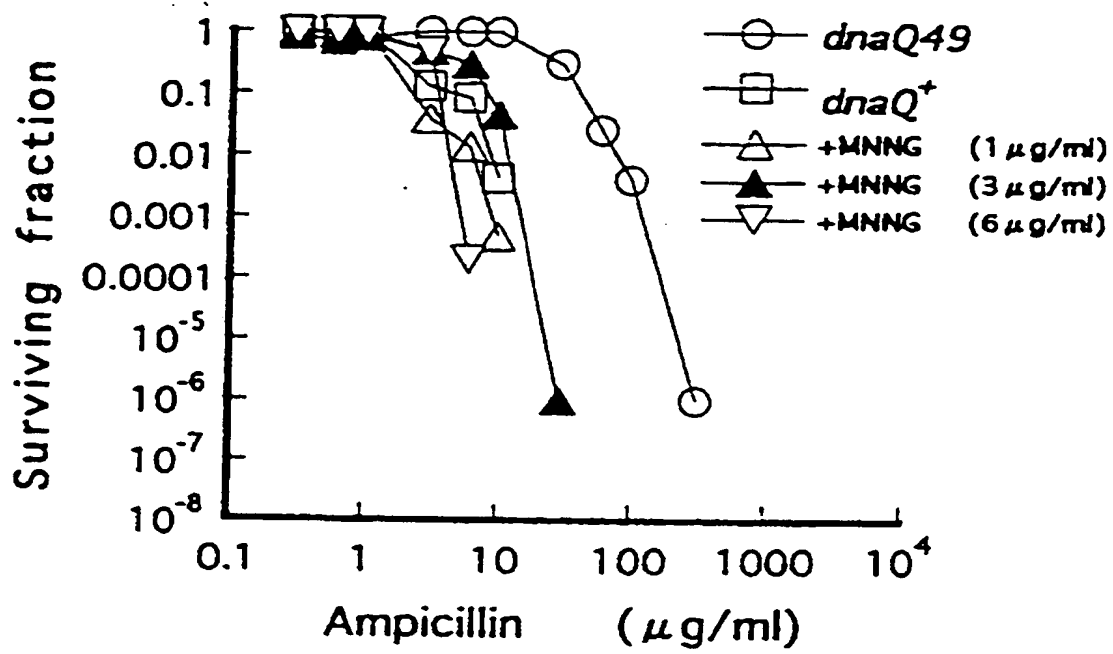
【図 1】



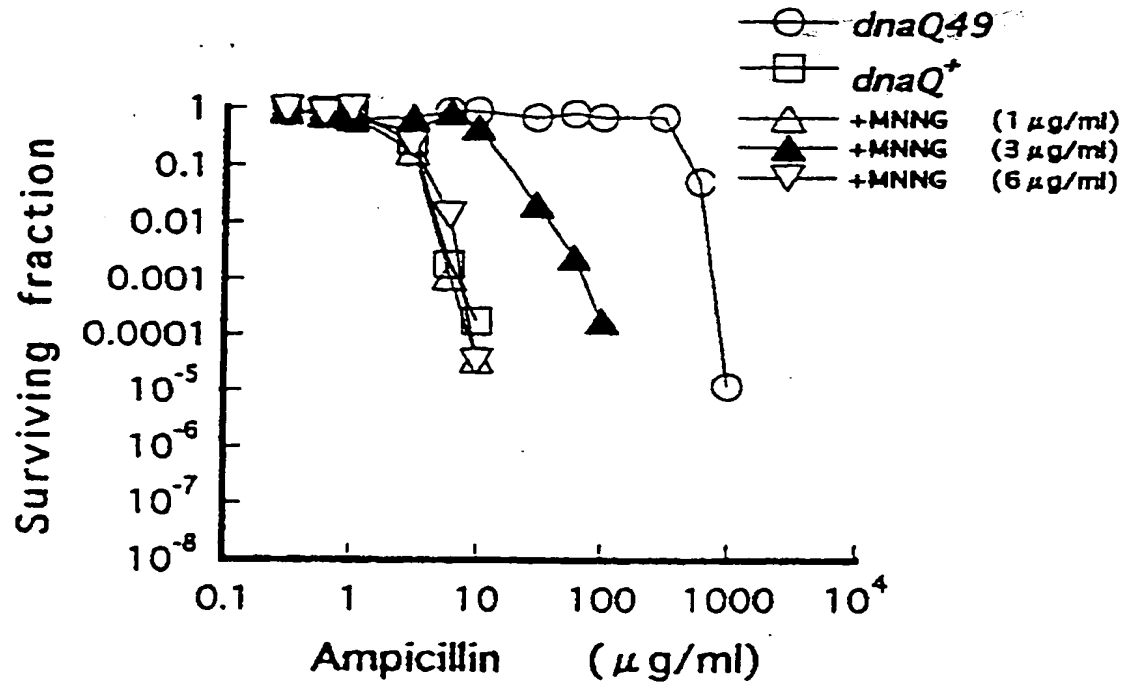
【図 2】



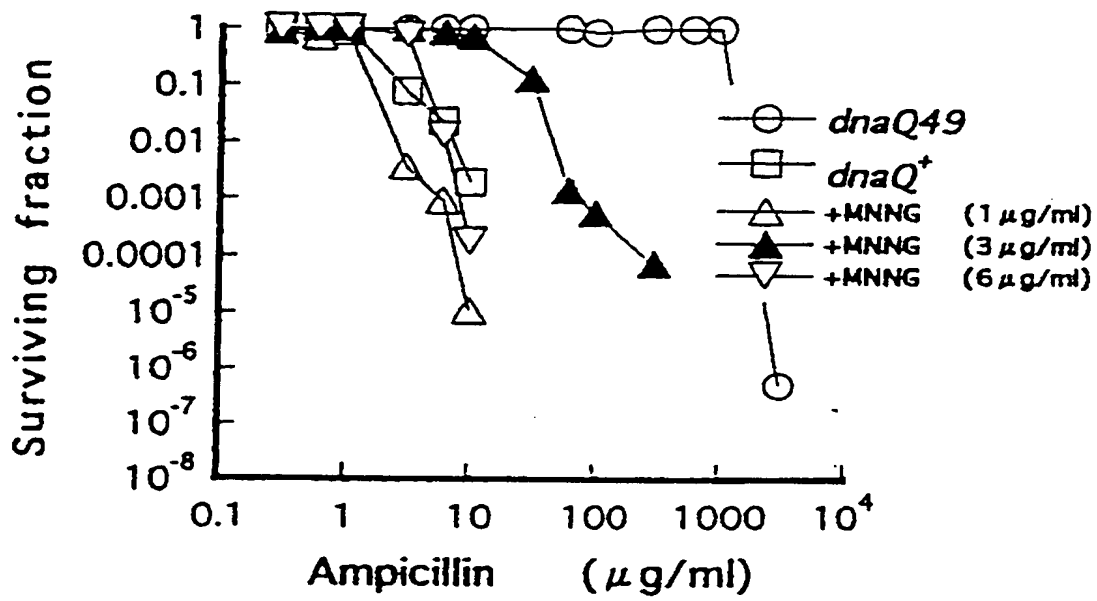
【図 3】



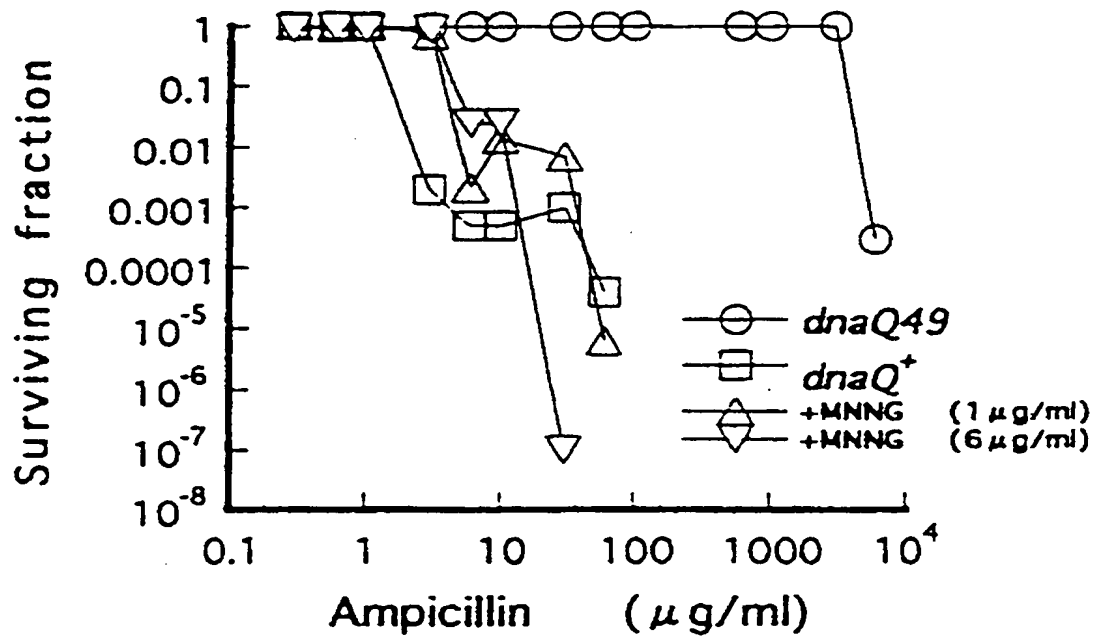
【図 4】



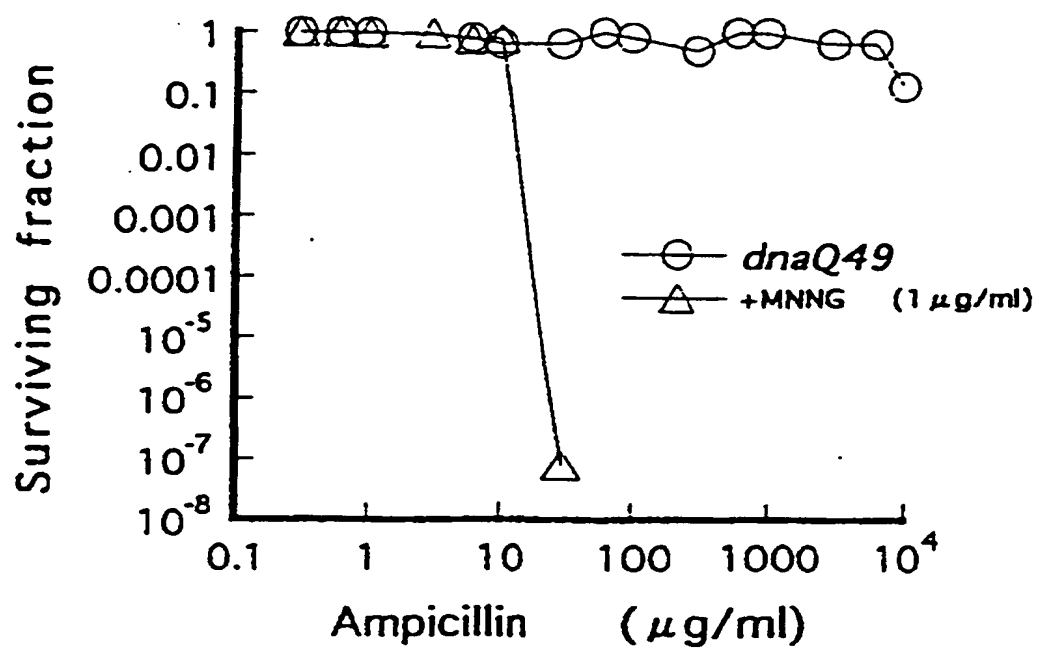
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞や生物個体に高い突然変異率でランダム突然変異を導入しつつ、同時に処理群の絶滅の危険性を低減し、効率よく有用かつ多様な突然変異体を得る方法を提供する。

【解決手段】 細胞または生物個体の二重鎖ゲノムDNAの一方の鎖に他方よりも多く点突然変異を導入することを特徴とする遺伝子への突然変異導入方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年11月11日

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093230

【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階

西澤国際特許事務所

【氏名又は名称】 西澤 利夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

THIS PAGE BLANK (USPTO)